

ISSR 표지자에 의한 동강할미꽃(*Pulsatilla tongkangensis*)의 유전다양성과 구조

김진수^{1*}, 조동광², 정지희¹, 김영희¹, 유기억³, 천경식³

¹고려대학교 생명과학대학, ²국립수목원, ³강원대학교 자연과학대학

Genetic diversity and structure of *Pulsatilla tongkangensis* as inferred from ISSR markers

Zin-Suh Kim^{1*}, Dong-Gwang Jo², Ji-Hee Jeong¹, Young-Hee Kim¹,
Ki-Oug Yoo³, and Kyoung-Sic Cheon³

¹College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 139-701, Korea

²Korea National Arboretum, Pocheon 487-821, Korea

³Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract - The genetic diversity and structure of *P. tongkangensis* in 5 populations from 3 regions was investigated using 56 markers derived from 6 ISSR primers. Genetic diversity at the species level ($P=94.6$, $SI=0.377$, $h=0.240$) was substantial considering the limited distribution and small size of populations. Genetic differentiation among regions (12%) and among populations (13%) in the region was not clearly evident, which suggested a moderate level of gene flow among adjacent populations. The Mantel test revealed a significant correlation between genetic differentiation (Φ_{ST}) and geographic distance among populations. This was supported by cluster analysis and principal coordinate analysis (PCoA). The significant difference in marker band frequency at many loci and their fixation in opposite directions in the smallest and most isolated population SC were considered due to genetic drift. Therefore, the genetic diversity of *P. tongkangensis* could be compromised if the distribution area or the size of the population was further reduced. In particular, small and isolated populations could be at great risk of extinction. Considering this, the unique habitats of *P. tongkangensis* should be protected and the reduction of population size should be closely monitored. Conservation efforts including the seeding and planting of seedlings should be done carefully based on their genetic and ecological traits. Our data support the argument that establishing an integrated management system for the efficient conservation of *P. tongkangensis* is critical.

Key words - *Pulsatilla tongkangensis*, Genetic diversity, Conservation, ISSR

서 언

동강할미꽃(*Pulsatilla tongkangensis* Y. Lee et T. C. Lee)은 미나리아재비과(Ranunculaceae)의 한국 특산 희귀 식물로 비교적 최근에 신종으로 발표되었다(Lee, 2000). 형태적으로는 할미꽃에 비해 꽃이 남보라색이고 분홍할미꽃에 비해서는 열매의 암술대가 꽃꽂이 선다는 점에서 차이가 난다(Lee, 2000). 또한 핵형에서도 5쌍의 중부염색체와 3쌍의 차단부염색체를 가지는 할미꽃이나 분홍할미꽃에

비해 동강할미꽃은 5쌍의 중부염색체, 2쌍의 차중부염색체 그리고 1쌍의 차단부염색체를 갖고 있음이 보고되었다(Lee et al., 2004). 개화기의 식물체 크기는 약 15 cm 가량이며, 4-6월 개화하고 6-7월에 열매가 성숙한다(Lee, 2000).

동강할미꽃은 동강을 따라 석회암 지역의 암벽지에 자생하며(Lee, 2000), 수면 위 2-20 m 사이의 양지바른 곳에 주로 자라고 있다(Wonju Regional Environmental Office, 2006b). 또한 강원도 정선의 자병산과 삼척 덕향산 일대에도 자생하고 있음이 보고된 바 있다(Kim et al., 2005). 2005년부터 시작된 자생지의 분포실태 조사 결과, 정선과 평창일

*교신저자(E-mail) : zskim@korea.ac.kr

대 6개소에서 약 500개체가 확인되었다(Wonju Regional Environmental Office, 2006a). 또한 2006년에 같은 장소에서의 정밀 조사를 통해 세 배 이상 되는 1,640개체가 자라고 있음이 보고되었다. 그럼에도 불구하고 일반에 널리 알려진 일부 자생지에서는 개체수가 20% 이상 감소되기도 하였다(Wonju Regional Environmental Office, 2006b). 동강할미꽃은 꽃이 아름다워 원예 가치가 높을 뿐더러 희소 가치가 있어 일부 지역에서는 무분별한 탐사와 채취로 인해 개체수가 급감하고 자생지 훼손의 심각성이 대두되었다. 이에 2007년부터는 지방자치 단체와 민간 환경단체에 의해 종자 산포 및 모종 이식 등의 방법을 이용한 자생지 복원 노력이 시작되었다(East Regional Forest Service, 2007; Save the Dongriver, 2008).

동강할미꽃은 IUCN 분류 기준에 의해 'endangered'로 분류되고 있는데(Korea National Arboretum, 2008), 그 위기 정도에 비해 보전을 위한 기초연구가 부족한 형편이다. 희귀식물을 보전하기 위한 전략은 서식처의 생태적 특성과 함께 해당 종의 생활사와 관련된 기초지식을 근거로 수립되어야 한다. 아울러 개체군의 적응능력과 밀접한 관계가 있는 유전다양성의 정도나 구조에 관한 정보도 확보되어야 한다(Kim, 2009). 그러나 동강할미꽃 관련 연구는 최근 종자의 특성이나 발아환경, 자생지 환경특성에 관한 일부 연구만 있을 뿐(Yoo *et al.*, 2009; Ahn *et al.*, 2009), 교배 양식이나 기타 생물학적 기본 특성이나 유전다양성에 대한 연구는 거의 이루어진 바 없다. 따라서 동강할미꽃을 효율적으로 보전하기 위해서는 자생지의 서식처 보호를 포함한 긴급처방과 함께 개체군 크기 및 유전적 구조 변화의 지속적인 감시 같은 장기적이고 체계적인 보전 연구가 필요할 것이다.

본 연구는 동강할미꽃의 자생지 보호와 유전자원 보존을 위한 기초자료를 제공할 목적으로, ISSR 표지자를 이용하여 동강할미꽃의 유전다양성 정도와 지역 및 지역 내 집단 간의 유전적 분화 정도를 추정하였다.

재료 및 방법

대상종의 자생지 특성 및 시료채취

강원도의 3개 지역, 5개 집단에서 총 177개체로부터 DNA를 추출하기 위해 소량의 잎 단편을 취득하였다(Table 1). 평창 지역(PC)의 3개 집단 중, 집단 PC1은 해발 약 220 m

의 바위틈에 200여개체가 산재해있었다. 집단 PC2와 PC3은 해발 약 500 m 전후의 산 능선부위에서 발견되었는데, 공히 30 - 40 m² 정도의 면적에 100 미만의 개체가 집중적으로 자라고 있었다. 이들 3개 집단은 반경 1 km 내에 존재하는데, 각각의 서식지가 크고 작은 암반으로 격리되어 별개의 집단으로 간주하였다. 정선의 집단 JS는 해발 약 240 m의 석회암 바위절벽으로 면적이나 개체수로 볼 때 상당히 컸으나 인위적인 훼손이 심한 곳이었다. 평창과 정선의 4개 집단은 동강 줄기를 따라 분포하며 최대 거리 10 km 이내에 위치하였다. 한편 삼척 집단(SC)은 해발 약 770 m의 산 능선에서 발견되었는데, 면적 약 14 m²의 크기에 30 미만의 개체가 서식하고 있었다. 평창과 정선 지역의 집단은 최소 22개체에서 57개체까지 분석 되었으나 삼척의 집단은 10개체만 조사되었다. 인접한 개체 간의 유전적 유사성을 피하기 위해 개체의 표본을 취할 때 50 cm 이상의 간격을 유지하였다.

DNA 추출 및 ISSR-PCR

100 mg의 잎 조직을 SDS lysis buffer(Ziegenhagen *et al.*, 1993)와 함께 곱게 갈아 40분간 62°C에서 반응하였다. 원심분리(9000rpm/1200s)후 상등액에 1/3 부피의 5 M potassium acetate를 넣고 아이스박스에서 20분간 반응하였다. 원심분리(9000rpm/1200s) 후 상등액에 동량의 chloroform / octanol(24:1)을 넣고 잘 섞은 후 다시 원심분리(15000rpm/1500s) 하였다. 이어 상등액에 2/3 부피의 isopropanol을 넣고 잘 섞은 후 1시간 이상 DNA를 침전시켰다. 원심분리 후 침전된 DNA를 70% ethanol에 세척 후 건조하여 TE buffer에 녹여 실험에 사용할 때까지 -20°C에 보관 하였다.

60개의 ISSR primer(50 from UBC primer set, Biotechnology Laboratory, University of British Columbia; 10 from Wolfe Laboratory, Department of Evolution, Ecology and Organismal Biology, The Ohio State University) 중 재현성이 높은 6개를 선정하여 분석에 사용하였다; 5개 UBC primer: #813, #815, #824, #836, #843; 1개 Wolf Lab. primer: Mao. PCR 반응액 20 μ l는 10 ng template DNA, 0.2mM dNTPs, 300nM primer, 0.00025% BSA, 1XPCR 반응 buffer(Biotherm, Genecreft), 그리고 1 unit *Taq* polymerase(Biotherm, Genecreft)로 조성되었다. PCR 반응은 T-gradient thermal cyler(Biometra)

를 사용하여, 먼저 1분 30초간 94°C에서 전처리 후, 40초간 94°C, 45초간 51°C, 그리고 1분 30초간 72°C의 3단계 사이클을 35회 반복하였다. 그리고 마지막으로 72°C에서 5분간 최종 증폭과정을 거쳤다. PCR 증폭산물은 1×TBE buffer pH8.0 를 사용하여 1.8% agarose gel(w/v)에서 2시간 동안 전기영동 되었다. 전기영동 후 gel을 ethidium bromide로 정색하여 UV trans-illuminator 상에서 사진을 찍어 분석에 사용하였다(Fig. 1).

자료분석

사진 자료로부터 선명하고 재현성이 높은 band만을 유전 다양성 분석의 대상으로 하였다. 각 size 별로 분석된 band 는 한 유전자좌의 산물로 간주하였고, 밴드의 존재 유무에 따라 단일 유전자좌의 두 개의 대립유전자와 관련된 두 가지 표현형(출현, 1; 비출현, 0)의 빈도로 데이터화 하였다. ISSR 표지자의 우성적 특성을 고려하여 모든 유전분석은 위의 band의 존재 여부에 따른 빈도에 근거하여 수행되었다. 다만 다른 연구 결과와의 비교를 위하여 열성 표현형의 빈도를 이용하여 Hardy-Weinberg 평형 가정 하에서 기대되는 대립유전자 빈도를 추정하여 Nei's(1973) 유전자 다양도(h)를 계산하였다. POPGENE v1.32 프로그램(Yeh *et al.*, 1999)을 이용하여 다형적 유전자좌의 비율(P)과 Shannon's information index(SI) (Shannon and Weaver, 1949)를 구했다. 유전다양성의 집단내 및 집단간 분포정도를 알아보기 위해 ARLEQUIN v.3.0 (Excoffier and Schneider, 2005)을 이용하여 AMOVA (analysis of molecular variance) 분석을 수행하였다. 또한 집단 간의 유전적 분화 정도(Φ_{ST})와 지리적 거리와의 상관 관계를 알아보기 위해 IBD program(Bohonak, 2002)을 이용하여 Mantel test를 수행하였다. 집단 간 유연관계를 알아보기 위한 유전적 거리(Nei, 1978)의 계산은 RAPDDIST v1.0 (Black, 1996)를 이용하였다. 이어 PHYLIP v3.5c

(Felsenstein, 1993)의 NEIGHBOR 프로그램에서 UPGMA 방법으로 유집한 후 최종적으로 TREEVIEW v1.6.6 프로그램(Page, 1993)에서 dendrogram을 산출하였다. 집단 간의 유연관계를 확인하기 위한 다른 방법으로 GENAIEX program(Peakall and Smouse, 2001)을 이용하여 주좌 표분석(Principal Coordinate Analysis; PCoA)을 수행하였다.

결 과

유전다양성

동강할미꽃 5개 집단에서 조사된 56개의 ISSR 표지자 밴드 중 53개에서 다형성을 보였다. 이 중 한 집단에서만 관찰된 고유 밴드가 6개였는데, 집단 PC1과 SC에서 각각 2개, 그리고 집단 PC3와 JS에서 각각 1개씩 관찰되었다(자료 미제공; 필요 시 교신저자를 통해 제공 가능). 확인된 6개 고유 밴드 중 3개는 모든 집단에서 0.064 미만의 낮은 빈도로 관찰되었으나, SC 집단의 2개 고유밴드는 각각 0.4, 0.6의 높은 빈도를 보였다. 또한 PC1 집단에서 관찰된 고유 밴드 중 하나도 0.208의 비교적 높은 빈도로 관찰되었다.

삼척 집단(SC)을 제외한 4개 집단의 다형적 유전자좌의 비율(P)은 집단 PC2 에서 62.5%로 가장 낮았고, 집단 PC1에서 69.6%로 가장 높은 값을 보였다(Table 1). 유전자좌당 평균 대립유전자수(A)와 유효대립유전자수(A_e) 역시 집단 PC2에서 각각 1.63과 1.33으로 가장 적었고, 집단 PC1에서 각각 1.70과 1.34로 가장 많았다. 한편 유전자 다양도(h)와 Shannon index(SI)는 집단 PC2에서 각각 0.198과 0.302로 가장 낮았고, 집단 PC3에서 각각 0.207과 0.318로 가장 높았다. 그러나 삼척 집단(SC)의 유전다양성은 다른 집단에 비해 월등히 낮았다($P=17.9\%$, $A=1.18$, $A_e=1.11$, $SI=0.095$, $h=0.063$).

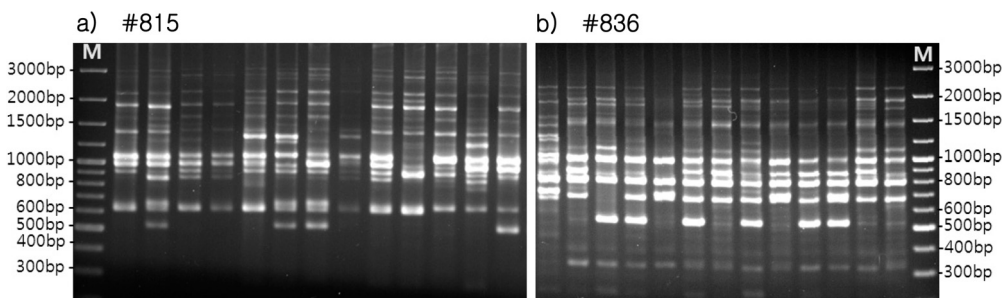


Fig. 1. Representative amplification profiles from two primers, a) #815 and b) #836

Table 1. Genetic variability at 56 ISSR loci in 5 populations of *P. tongkangensis*

Pop. ¹	Area	Altitude	N	P	A	A _e	SI	h
PC1	250	240	49.8	69.6	1.70	1.34	0.317	0.206
PC2	40	500	34.0	62.5	1.63	1.33	0.302	0.198
PC3	32	610	22.3	66.1	1.66	1.34	0.318	0.207
JS	400	280	57.5	67.9	1.68	1.34	0.312	0.203
SC	14	770	9.4	17.9	1.18	1.11	0.095	0.063
Mean	140	480	34.6	56.8	1.57	1.29	0.269	0.175
Mean ²	180.5	407.5	40.9	66.5	1.67	1.34	0.312	0.204
Total	-	-	172.9	94.6	1.95	1.38	0.377	0.240

¹Population- PC: Pyeong-Chang, JS: Jeong-Seon, SC: Sam-Cheok (The exact locations of these populations are not shown to prevent further damage to the habitats)

²Mean of 4 populations except SC

N = number of individuals analyzed; P = percentage of polymorphic loci; A = number of alleles per locus; A_e = effective number of alleles per locus; SI = Shannon's (1949) index; h = Nei's (1973) gene diversity

Table 2. Analysis of molecular variance (AMOVA) at 56 ISSR loci in 5 populations of *P. tongkangensis*

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among regions	2	121.35	0.695	11.87
Among populations within regions	2	60.47	0.761	13.01
Within populations	172	755.85	4.394	75.11
Total	176	937.75	5.850	

$\Phi_{SC}=0.148^{***}$, $\Phi_{ST}=0.249^{***}$, $\Phi_{CT}=0.119$ (n.s.)

Φ_{SC} =Genetic differentiation among populations within regions.

Φ_{ST} =Genetic differentiation among populations.

Φ_{CT} =Genetic differentiation among regions.

Table 3. Geographic distance (above diagonal; km) and genetic differentiation (below diagonal; Φ_{ST}) between all pairs of populations

Population	PC1	PC2	PC3	JS	SC
PC1	***	0.52	0.90	10.50	38.50
PC2	0.174	***	0.64	10.30	38.40
PC3	0.151	0.048	***	10.00	38.00
JS	0.217	0.160	0.157	***	35.00
SC	0.445	0.423	0.458	0.415	***

집단 분화 및 유연관계

AMOVA 분석 결과 전체 유전변이의 약 25%가 집단 간 차이에 기인하는 것으로 설명되었고, 나머지 75%는 집단 내 개체 간에 존재 하였다(Table 2). 개체수가 가장 작았던 삼척 집단(SC)을 제외했을 때 집단 간 분화 정도는 약 16.2%로 줄었다($\Phi_{ST}=0.162$, 표에 제시되지 않음). 집단 간 분화 정도인 25%의 유전변이는 다시 세 지역 간 차이 약 12%,

지역 내 집단 간 차이 약 13%로 분할되었다.

모든 집단 쌍간의 유전적 분화 정도는 인접하고 있는 집단 PC2와 PC3 사이가 0.048로 가장 낮았고, 가장 멀리 떨어진 집단 SC와 집단 PC3 사이의 값이 0.458로 가장 높았다(Table 3). 삼척 집단은 다른 집단과의 분화정도가 평균 0.435 ± 0.02로 다른 4개 집단 간 모든 조합의 평균 0.151 ± 0.056에 비해 월등히 높았다. 이에 따라 지리적 거리와 유전적 분

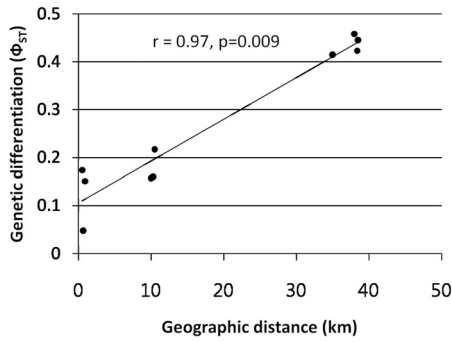


Fig. 2. Correlation between genetic differentiation and geographic distance.

화정도와의 상관을 알아보기 위한 Mantel test에서도 역시 $r=0.97(p=0.009)$ 로 고도의 유의성이 인정되었다(Fig. 2).

집단 간 유전적 거리에 기초한 유집분석 결과, 지리적으로 서로 가까운 평창 지역 3개 집단이 먼저 소그룹을 형성하였고 그 위에 정선(JS) 집단이 유집되었으며 최종적으로 삼척(SC) 집단이 합쳐졌다(Fig. 3). 집단별 주좌표분석(PCoA)에서는 평창, 정선, 삼척 집단이 명확하게 구분 되었는데, 약 56%를 설명력을 지닌 제 1 주좌표에서는 삼척 집단이 뚜렷이 분리되었고, 약 15.6%를 설명하는 제 2 주좌표에서는 정선 집단이 이질적으로 나타났다(Fig. 4a). 개체별 분석에서는 우선 제 1 주좌표와 제 2 주좌표의 설명력이 각각 23.5%와 20.1%로 감소하였고, 이에 따라 지역 또는 집단 간의 관계 역시 다소 다르게 나타났다(Fig. 4b). 평창의 3개 집단과 정선 집단의 분리 정도가 상당히 약해졌으며, 특히 집단 PC2와 PC3의 개체들과 정선 집단(JS)의 개체들이 부분적으로 섞이는 경향을 보였다. 삼척의 SC 집단은 여전히 이질적으

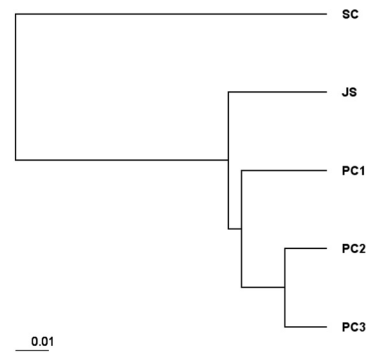


Fig. 3. Dendrogram using the UPGMA method based on Nei's (1978) genetic distance for 56 ISSR loci from 5 populations of *P. tongkangensis*. The abbreviations of 5 populations are the same as in Table 1.

로 분리되었지만 주로 제 2 주좌표에서의 차이에 기인하는 것으로 나타났다(Fig. 4b).

고 찰

삼척 집단(SC)을 제외한 동강할미꽃 4개 집단에서 관찰된 유전다양성 평균($P=66.5\%$, $h=0.204$)은 RAPD 표지자에서 조사된 다년생 초본류의 평균($h=0.242$) 보다 낮고, 자식과 타식이 함께 이루어지는 종($h=0.219$)과 유사하였으며, 분포 영역이 제한된 특산 종($h=0.191$)에 비해서 다소 높은 수준이었다(Nyblom and Bartish, 2000). 그러나 유럽에 널리 분포하는 같은 속의 *Pulsatilla vulgaris*에서 관찰된 RAPD 표지자에서의 유전자 다양도(gene diversity; h), 0.321 (0.253–0.380) 보다는 훨씬 낮았다(Hensen *et al.*, 2005).

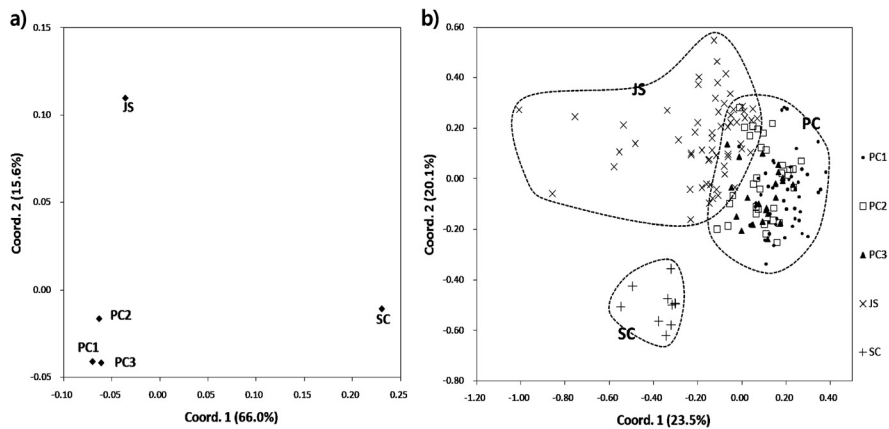


Fig. 4. Principal coordinates analysis (PCoA) by populations (a) and individuals (b) using Nei's (1978) genetic distance from 5 populations of *P. tongkangensis*.

동일종에서 조사된 ISSR, RAPD 및 AFLP 우성 표지자에서의 유전변이 정도는 유사하게 나타나 직접비교가 가능한 것으로 판단된 바 있다(Nybom, 2004). 따라서 동강할미꽃의 제한적인 분포특성과 작은 집단크기를 고려할 때 관찰된 유전다양성은 상당한 수준으로 평가되었다. 한편 동강할미꽃 4개 집단의 유전다양성 정도는 강원도 일부 집단에서 조사된 할미꽃의 ISSR 유전다양성에 비해서도 높은 수준이었다(Jeong *et al.*, 2009). 그러나 보다 객관적인 비교는 충분한 수의 할미꽃 집단에 대한 유전분석이 이루어져야만 가능할 것으로 판단되었다.

AMOVA 분석 결과 전체 유전변이의 약 12%가 지역 간 차이로, 약 13%가 지역 내 집단 간 차이로, 나머지 75%가 집단 내 개체 간 차이로 설명되었다(Table 2). 이는 유럽에 널리 분포하는 할미꽃속 *P. vulgaris*를 대상으로 RAPD 표지자로 조사된 집단 간 유전적 분화정도인 17%와 유사한 수준이었다(Hensen *et al.*, 2005). 그러나 RAPD 표지자에 의해 조사된 다년생 초본류의 집단 간 유전적 분화정도(Φ_{ST})의 평균 0.25, 자식과 타식이 함께 일어나는 종의 0.27, 특산이나 제한 분포 종에서 조사된 평균 각각 0.2, 0.34에 비해서는 다소 낮은 수준이었다(Nybom and Bartish, 2000). 또한 그 동안 ISSR 표지자로 조사된 다른 다년생 희귀 초본류에서의 Φ_{ST} 값이 0.5 이상의 높은 값을 보이는 예가 많아(Qiu *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2005), 동강할미꽃의 집단분화정도는 상대적으로 낮은 것으로 평가되었다.

제한된 지역에 소집단으로 분포하는 동강할미꽃의 유전다양성이 특별히 낮지 않고 집단 간 차이도 현저하지 않은 점은 나름대로의 이유가 있을 것으로 생각된다. 그 동안의 서식지 실태조사 결과에 따르면 평창과 정선지역의 동강할미꽃의 집단크기는 최소 60에서 최대 600개체에 불과했다(Wonju Regional Environmental Office, 2006b). 본 연구에 포함된 집단의 크기도 대부분 100개체 미만으로 조사되었다. 대부분의 동강할미꽃 집단은 불과 수 km에서 10 km의 범위 안에 산재해있다. 따라서 인접한 크고 작은 집단 간에 유전자 교류가 원활히 이루어져 집단 내의 유전다양성이 어느 정도 유지되고 집단 간의 차이도 심화되지 않는 것으로 추정할 수 있었다. 본 연구에서 확인된 집단 간의 지리적 거리와 유전적 분화정도와의 강한 상관관계가 위의 추정을 뒷받침하는 것으로 간주되었다(Table 3, Fig. 2).

그럼에도 불구하고 생육지의 환경변화나 훼손에 의해 동강할미꽃의 집단 크기가 계속 감소하면 유전다양성이 심각하

게 감소할 뿐만 아니라 집단 전체의 절멸로 이어질 우려가 있다. 제한적으로 분포하는 특산종은 작은 집단 크기에 따른 근친교배나 유전적 부동의 영향으로 집단 내 유전다양성이 빈약한 경우가 많다(Hamrick and Godt, 1996; Gitzendanner and Soltis, 2000). 삼척 집단(SC)은 현저히 낮은 수준의 유전변이를 지니고 다른 집단과의 유전적 차이가 가장 심한 것으로 나타났는데(Table 1, 3), 이는 전적으로 집단크기가 작고 다른 집단들과 상대적으로 멀리 떨어져 있기 때문인 것으로 보인다. 고립된 소집단에서는 유전적 부동의 영향으로 대립유전자 빈도가 다른 집단과 크게 다르거나 심한 다른 방향으로 고정되기도 한다. 실제로 삼척집단에서는 적어도 7개 이상의 유전자좌에서의 표지자 밴드의 빈도가 다른 집단과 현저히 다르거나 다른 방향으로 고정되어(Fig. 5), 유전적 부동의 영향이 강하게 작용하고 있음을 알 수 있었다.

동강할미꽃 집단의 분화정도 및 유연관계는 주로 지리적 거리 정도와 부분적으로 집단크기에 의해 영향을 받는 것으로 나타났다(Fig. 3 - 5). 유집분석과 주좌표분석의 결과를 통해 인접한 지역이나 집단 간의 밀접한 유전적 유연관계

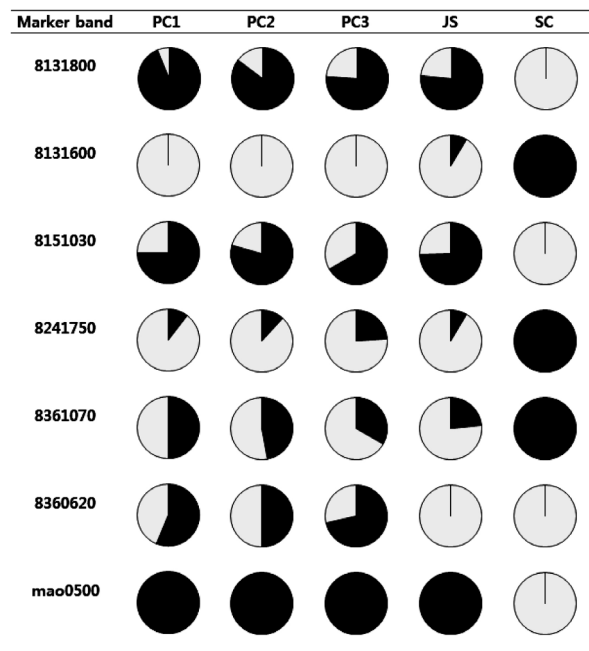


Fig. 5. Representatives of the loci at which the most frequent phenotypes are different among the 5 populations of *P. tongkangensis*. The black components in each pie graph denote marker band frequency. The abbreviations of the 5 populations are the same as in Table 1.

와 함께 고립된 소집단 SC의 이질성을 확인할 수 있었다. 동강할미꽃의 유전다양성 보전을 위해서는 무엇보다 고유의 서식처 환경을 보호하여 집단크기의 감소나 집단 간의 연결성이 더 이상 훼손되지 않도록 해야 할 것이다. 집단크기나 생태적 구조 변화에 대한 장기적 감시연구와 함께 교배양식이나 유전적 특성에 관한 기초연구도 수행되어야 한다. 또한 유사종인 분홍할미꽃이나 다른 관련종과의 유전적 차이 정도와 유연관계에 대한 연구도 함께 이루어져야 할 것이다. 현지에서의 종자산포나 이식 등의 보전 조치는 생태적, 유전적 특성을 고려하여 신중히 이루어져야 하며, 종자 저장 등의 현지의 보전 방법도 검토되어야 한다. 귀한 생물자원인 동강할미꽃에 대해 관심을 갖는 기관과 단체가 많은 만큼, 통합적인 보전 체계를 수립하는 일도 시급한 과제이다.

적 요

본 연구는 ISSR 표지자를 이용하여 동강할미꽃 3개 지역, 5개 집단, 총 177 개체로부터 유전적 특성을 구명하기 위하여 수행되었다. 6개 ISSR primer의 56개 표지자에서의 중 수준에서의 유전다양성은 $P=94.6$, $SI=0.377$, $h=0.240$ 로, 제한된 분포와 작은 집단크기를 고려할 때 상당한 수준으로 평가되었다. AMOVA 분석 결과 전체 유전변이의 약 12%가 지역 간에, 약 13%가 지역 내 집단 간에 존재하는 것으로 나타나, 지역 및 집단에 따른 분화정도는 상대적으로 낮은 것으로 평가되었다. 이는 인근집단 간에 유전자 교류가 비교적 원활히 이루어지기 때문으로 판단되었다. 동강할미꽃 집단 간 분화정도는 주로 지리적 거리에 의해 영향을 받는 것으로 나타났으며, 유집분석과 주좌표분석을 통해서도 이를 확인할 수 있었다. 크기가 작고 고립된 삼척 집단(SC)에서는 많은 유전자좌에서의 표지자 밴드의 빈도가 현저히 다르거나 다른 방향으로 고정되어 유전적 부동이 진행되고 있음을 알 수 있었다. 앞으로 동강할미꽃의 집단크기가 계속 감소하면 유전다양성이 심각하게 훼손될 뿐만 아니라 집단 전체의 절멸로 이어질 우려가 있다. 따라서 동강할미꽃의 보전을 위해서는 무엇보다 고유의 서식처 환경을 보호하여 집단크기가 감소하거나 집단 간의 연결성이 훼손되지 않도록 해야 할 것이다. 현지에서의 종자산포나 이식 등의 보전 조치는 생태적, 유전적 특성을 고려하여 신중히 이루어져야 한다. 또한 집단의 유전적 구조 변화 등에

관한 기초연구와 함께 동강할미꽃의 효율적 보전을 위한 통합적인 체계 구축이 시급한 과제 중의 하나이다.

사 사

본 연구는 산림청 ‘산림과학기술개발사업(과제번호: S110 808L0601004)’의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

인용문헌

Ahn, C. H., H. S. Lee and J. S. Yi. 2009. Seed characteristics and germination conditions of *Pulsatilla tongkangensis*. Kor. J. Breeding Sci. 41: 201-201.
Black, W. C. IV. 1996. RAPDDIST 1.0. Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins. CO. USA.
Bohonak, A. J. 2002. IBD (isolation by distance): a program for analyses of isolation by distance. J. Hered. 93: 154-155.
East Regional Forest Service. 2007. Restoration of *Pulsatilla tongkangensis* <http://east.forest.go.kr/>.
Excoffier, L. G. L. and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol. Bioinf. Online 1: 47-50.
Felsenstein, J. 1993. PHYLIP v3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA. USA.
Gitzendanner, M. A. and P. S. Soltis. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. Amer. J. Bot. 87: 783-792.
Hamrick, J. L. and M. J. W. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 351: 1291-1298.
Hensen, I., C. Oberprieler and K. Wesche. 2005. Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla bulgaris* Mill. (Ranunculaceae) in Central Germany. Flora 200: 3-14.
Jeong, J. H., E. H. Kim and Z. S. Kim. 2009. Genetic diversity and differentiation in *Pulsatilla tongkangensis* and *Pulsatilla koreana*. p. 139 In: Proc of the 4th Annual Meeting of The Korean Association of Societies of Plant Science. October 26-27, Hotel Seoul Kyoyuk Munwha Hoekhwan.
Kim, J.-S. B.-C. Lee, J.-M. Chung and J.-H. Pak. 2005. Flora and phytogeography on Mt. Deokhang (Gangson-do),

- limestone area in Korea. Korean J. Pl. Taxon. 35: 337-364.
- Kim, Z.-S. 2009. Developing sampling strategies for genetic conservation of endangered plant species. proceedings of 'International Symposium on Climate Change and Biodiversity Conservation'. pp. 11-21. May 25-26. Korea National Arboretum.
- Korea National Arboretum. 2008. Rare plant data book in Korea. Geobook, Korea.
- Lee, W. K., H. W. Choi and J. W. Bang. 2004. Karyotype analysis of five species of genus *Pulsatilla*. Korean J. Medicinal Crop Sci. 12: 490-493.
- Lee, Y. N. 2000. *Pulsatilla* in Korea. Bulletin of Korea Plant Research 1: 9-15.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Mol. Ecol. 13: 1143-1155.
- Nybom, H. and IV. Bartish. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst. 3: 93-114.
- Page, R. D. M. 1996. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.
- Peakall, R. and P. E. Smouse. 2001. GenAIEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [Internet]. [cited 2005 August]. Canberra, Australia: Australian National University. Available from: <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx/>.
- Qiu, Y.-X., D.-Y. Hong, C.-X. Fu and K. M. Cameron. 2004. Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium myrnioides* (Apiaceae). Biochemical systematics and Ecology 32: 583-596.
- Save the Dongriver. 2008. Restoration planting of *Pulsatilla tongkangensis*. <http://dongriver.com/>.
- Shannon, C. E. and W. Weaver. 1949. The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois Press, Urbana.
- Wonju Regional Environmental Office. 2006a. Survey plan for the habitats and distribution of *Pulsatilla tongkangensis*. <http://wonju.me.go.kr>.
- Wonju Regional Environmental Office. 2006b. Habitats and distribution of *Pulsatilla tongkangensis* (2nd-year report). <http://wonju.me.go.kr>.
- Xia, T., S. Chen, S. Chen and X. Ge. 2005. Genetic variation within and among populations of *Rhodiola alsia* (Crassulaceae) native to the Tibetan plateau as detected by ISSR markers. Biochemical genetics 43: 87-101.
- Yeh, F. C., R. C. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. University of Alberta, Edmonton, Canada.
- Yoo, K. O., K. S. Cheon, S. K. Jang. 2009. Environmental and ecological characteristics of *Pulsatilla tongkangensis* habitats. Korean Journal of Environment and Ecology 23: 439-446.
- Ziegenhagen, B, P. Guillemaut and F. A. Scholz. 1993. A procedure for mini-preparations of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba* Mill.). Plant Mol. Biol. Rept. 11: 117-121.

(접수일 2009.11.13; 수락일 2010.8.13)